



2000-2002

תקופת המחקר:

256-0565-02

קוד מחקר:

Subject: ROSE COLOR FADING DUE TO TRANSIENT ENVIRONMENTAL STRESS

Principal investigator: MICHAL SHAMIR

Cooperative investigator: DAVID WEISS, ADA NISSIM-LEVY, DAVID COHEN, RINAT OVADIA

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: החווירת זני הורדים מרצדס ויגואר כתוצאה מעקות חולפות: אפיון ומציאת פתרונות

חוקר ראשי: מיכל שמיר

חוקרים שותפים: דוד וייס, עדה נסים, דוד כהן, רינת עובדיה

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

תקציר

רקע - אחת הבעיות בורדים המורידה ממחיר הפרח היא שינוי צבע עלי הכותרת כתוצאה משינויי טמפרטורה. במחקר זה התמקדנו בעקת טמפרטורה גבוהה וחולפת (בדומה לתנאי בתמסין) והשפעתה על צבע פרחי הזן 'יגואר'. בעבודה קודמת שלנו על צמחי 'יגואר' מצאנו שעקת חום חולפת זו גרמה לירידה בריכוז האנטוציאנינים הכללי בפקעים בשלב קטיפה.

המטרות העיקריות של ההצעה נוכחית הן: 1. הבנה מעמיקה יותר של תופעת שינוי הרכב האנטוציאנינים כתוצאה מעקת חום חולפת, ו-2. המשך האפיון הפיזיולוגי של השפעת תנאי טמפרטורה שונים, והעיקר טמפרטורות לילה גבוהות, על צבע הפרחים.

תוצאות ומסקנות - כאשר ניתנה עקת חום זמנית לפקעים בשלב ההתפתחות הרגיש ביותר, נראה כי פעילות האנזים CHI isomerase (Chalcon) ונוכחותו של החלבון CHS (Chalcon synthase) ירדו מעט בשלבי התפתחות מאוחרים. עקת חום זמנית, שניתנה בשלב התפתחות מוקדם יותר, לא השפיעה משמעותית על תכולתם של החלבונים CHS ו- F3'H (Flavonoid 3'-hydroxylase), למרות שערכה את הצטברות הפיגמנט. לעומת זאת, כמות התעתיקים של הגנים *chs* ו- *dfr* (Dihydroflavonol-4-reductase) ירדה מיד בסיום העקה, כאשר היא ניתנה בשלבי ההתפתחות הרגישים של הפקע. ישנה קורלציה בין דפוס הצטברות תעתיקי גנים אלו בצמחי ביקורת, לבין דפוס הצטברות הפיגמנט בפרח. למרות שנמצאה השפעה ברורה של עקת החום על ביטוי הגנים, כמעט ולא נמצאו שינויים ברמת החלבונים. נדרשת בדיקה מקיפה יותר כדי להבין את מכלול הסיבות לפגיעה בצבע הפרח.

במקביל בחנו השפעת טמפרטורות לילה גבוהות על רמת האנטוציאנינים בורדים. הדעה הרווחת אצל מגדלי הורדים היא שבחמסנים, הנזק העיקרי על צבע הפרחים נגרם על ידי טמפרטורות הלילה הגבוהות יחסית ופחות על ידי טמפרטורות היום. מניסיונות שבוצעו על ידינו, נראה שלטמפרטורות הלילה השפעה מועטה על צבע הפרחים.

פרסומים

1. Dela G., Or E., Ovadia R., Nissim-Levi A., Weiss D. and Oren-Shamir M. (2003). Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. *Plant Sci.*, 164, 333-340.

החזרת זני הורדים מרצדס ויגואר כתוצאה מעקות חולפות: אפיון ומציאת פתרונות.

Rose color fading due to transient environmental stress.

דוח מסכם

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף הפרחים

ד"ר מיכל שמיר צמחי נוי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.
עדה ניסים-לוי צמחי נוי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.
רינת עובדיה צמחי נוי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.
ד"ר דוד וייס מטעים וצמחי נוי, הפקולטה לחקלאות, רחובות.

Michal Oren-Shamir, Ornamental Horticulture Dept. ARO, Bet Dagan. E-mail:
lporen@wicc.weizmann.ac.il

Ada Nissim-Levi, Ornamental Horticulture Dept. ARO, Bet Dagan

Rinat Ovadia, Ornamental Horticulture Dept. ARO, Bet Dagan

David Weiss, Horticulture Dept. Agriculture Faculty, The Hebrew University, Rehovot. E-mail:
Weiss@agri.huji.ac.il

* אני מאשרת שהממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר: 

תקציר

אחת הבעיות בורדים המורידה ממחיר הפרח היא שינוי צבע עליו הכותרת כתוצאה משינוי טמפרטורה. במחקר זה התמקדנו בעקת טמפרטורה גבוהה וחולפת (בדומה לתנאי בחמסין) והשפעתה על צבע פרחי הזן 'יגואר'. בעבודה קודמת שלנו על צמחי 'יגואר' מצאנו שעקת חום חולפת זו גרמה לירידה בריכוז האנטוציאנינים הכללי בפקעים בשלב קטיף. שתי המטרות העקריות של ההצעה נוכחית הן: 1. הבנה מעמיקה יותר של תופעת שינוי הרכב האנטוציאנינים כתוצאה מעקת חום חולפת, ו-2. המשך האפיון הפיזיולוגי של השפעת תנאי טמפרטורה שונים, והעיקר טמפרטורות לילה גבוהות, על צבע הפרחים.

כאשר ניתנה עקת חום זמנית לפקעים בשלב ההתפתחות הרגיש ביותר, נראה כי פעילות האנזים (Chalcon) isomerase CHI ונוכחותו של החלבון CHS (Chalcon synthase) ירדו מעט בשלבי התפתחות מאוחרים. עקת חום זמנית, שניתנה בשלב התפתחות מוקדם יותר, לא השפיעה משמעותית על תכולתם של החלבונים CHS ו-F3'H (Flavonoid 3'-hydroxylase), למרות שערכה את הצטברות הפיגמנט. לעומת זאת, כמות התעתיקים של הגנים *chs* ו-*dfr* (Dihydroflavonol-4-reductase) ירדה מיד בסיום העקה, כאשר היא ניתנה בשלבי ההתפתחות.

הרגישים של הפקע. ישנה קורלציה בין דפוס הצטברות תעתיקי גנים אלו בצמחי ביקורת, לבין דפוס הצטברות הפיגמנט בפרח. למרות שנמצאה השפעה ברורה של עקת החום על ביטוי הגנים, כמעט ולא נמצאו שינויים ברמת החלבונים. נדרשת בדיקה מקיפה יותר כדי להבין את מכלול הסיבות לפגיעה בצבע הפרח.

במקביל בחנו השפעת טמפרטורות לילה גבוהות על רמת האנטוציאנינים בורדים. הדעה הרווחת אצל מגדלי הורדים היא שבחמסינים, הנזק העקרי על צבע הפרחים נגרם על ידי טמפרטורות הלילה הגבוהות יחסית ופחות על ידי טמפרטורות היום. מנסיונות שבוצעו על ידינו, נראה שלטמפרטורות הלילה השפעה מועטה על צבע הפרחים.

רשימת פרסומים:

1. Dela G., Or E., Ovadia R., Nissim-Levi A., Weiss D. and Oren-Shamir M. (2003). Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. Plant Sci., 164, 333-340.

מבוא (רקע מדעי ומטרות)

אחת הבעיות בורדים המורידה ממחיר הפרח היא שינוי צבע עלי הכותרת כתוצאה משינויי טמפרטורה. במחקר זה התמקדנו בעקת טמפרטורה גבוהה וחולפת (בדומה לתנאי חמסין) והשפעתה על צבע פרחי הזן 'יגואר'. מטרתנו היא לאפיין השפעת עקת טמפרטורה גבוהות וזמניות על צבע פרחי יגואר, וללמוד את התופעה בצורה מעמיקה יותר מבחינה ביוכימית על מנת להציע דרכים למניעת הנזק הנגרם לפרחים, או הקטנתו.

בעבודה קודמת שלנו על צמחי 'יגואר' בחנו סדרה של עקות חום חולפות על חלקי הצמח השונים. מטרתנו היתה לאפיין את תופעת שינוי צבע הפרחים כתוצאה מעקות אלו, ולמצוא תנאי עקה הגורמים לשינויים ברורים ומדידים בצבע הפרחים, כבסיס להמשך עבודה ביוכימית מעמיקה יותר. מבין העקות שנתנו לצמחים, התנאים שגרמו לדהיית צבע ברורה מבלי לגרום לשינוי פנוטיפי אחר בצמח, היו עקה לפקעים בלבד של 39°C ביום (למשך 12 שעות) ו- 18°C בלילה, עם לחות קבועה של 75%-80% למשך שלושה ימים. אחרי העקה הצמחים הוחזרו לתנאי הגידול שבהם היו לפני מתן העקה ($26^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$). שלבי התפתחות הפקע הרגישים ביותר לעקות אלו היו שלבים 2 ו-3 (השלבים נקבעו מ-1 ועד 6 על פי קוטר הפקע, כאשר שלב 7 הוא קטיפה לפני פתיחת הפרח).

מצאנו שעקת חום חולפת זו גרמה לירידה בריכוז האנטוציאנינים הכללי בפקעים בשלב קטיפה. למעשה, ריכוז האנטוציאנינים ירד למחצית ביחס לצמחי הביקורת. בנוסף לכך, היחס בין האגליקונים המרכיבים את צבע הפרחים השתנה: היחס בפרחי ביקורת בשלב קטיפה הוא 1:1 בין

פלרגונידין לציאנידין ובפרחים שעברו עקת חום הוא 2:1 לטובת הפלרגונידין. שינויים אלו מרמזים על אפשרות שהאנזים F3'H (Flavonoid 3' hydroxylase) המפריד כנראה בין שני אנטוציאנינים אלו במסלול הסינתזה, רגיש במיוחד לעקת החום. מטרת המשיך העבודה היא לבחון האם היפותזה זו נכונה, ואלו עוד שלבים במסלול הסינתזה רגישים במיוחד לעקת טמפרטורה גבוהה.

שתי המטרות העקרויות של העבודה היו: 1. הבנה מעמיקה יותר ברמה הביוכימית ומולקולרית של תופעת שינוי הרכב האנטוציאנינים כתוצאה מעקת חום חולפת, ו-2. המשך האפיון הפיזיולוגי של השפעת תנאי טמפרטורה שונים על צבע הפרחים, ובעיקר השפעת טמפרטורות לילה גבוהות על הצבע.

פירוט הניסויים והתוצאות

העבודה במשך שלוש שנות המחקר התמקדה בשני ערוצים מקבילים: 1. הבנה מעמיקה יותר של תופעת שינוי הרכב האנטוציאנינים כתוצאה מעקת חום חולפת, ו-2. אפיון פיזיולוגי של השפעת תנאי טמפרטורת לילה גבוהים על צבע הפרחים. להלן פירוט הניסויים:

1. מהו הגורם לשינוי הרכב האגליקונים (פלרגונידין וציאנידין) כתוצאה מעקת חום זמנית?
כפי שצוין במבוא, בנוסף לירידה כללית בריכוז האנטוציאנינים בפרחים כתוצאה מעקת חום זמנית, היחס בין שני האגליקונים המרכיבים את הצבע השתנה מיחס של 1:1 בין פלרגונידין לציאנידין בפרחי הביקורת, ליחס של 2:1 לטובת הפלרגונידין. יתכן שהאנזים F3'H רגיש במיוחד לעקה ורמתו ו/או פעילותו יורדת יותר מפעילות האנזימים האחרים במסלול הסינתזה. על מנת לבחון היפותזה זו, נמדוד את רמת האנזים בפקעים בזמן התפתחותם.

לשם כך פותחה שיטת מיצוי חלבונים מרקמת עלי כותרת של ורדים על בסיס שיטת Phenol extraction לפי Hurkman and Tanaka (1986) על מנת להתמודד עם אוקסידציה של החלבונים על יד הפוליפנולים הרבים שנמצאים ברקמה. שיטות מיצוי חלבונים קונבנציונליות לעלי כותרת של פרחים, לא התאימו לרקמת פרחי ורדים. מיצויי החלבון מרקמת הפקעים בשלבי התפתחות שונים, הורצו על גיל אקרילמיד והועברו לממברנת ניטרצולוז.

לקבלת נוגדן ספציפי ל-F3'H נבחר מקטע של 19 חומצות אמינו מה-cDNA של הגן שמקודד ל-F3'H בורד. הגן נמצא באתר הפטנטים של IBM (www.patents.ibm.com). המקטע נמצא בין חומצות האמינו 238 לבין 259, והרצף שלו הוא: KMKKLHKRFDDFLTAIVEDHKK. מקטע זה נבחר בגלל הספציפיות שלו לגן ה-F3'H (נבדק בעזרת תוכנת Blast) וכן בגלל שהוא עשיר יחסית בחומצות: Asp, Arg, Lys, דבר המאפיין אתרים אימונולוגיים בחלבונים. מקטע זה סונטז לפפטיד (במעבדת שירות במכון וייצמן), קושר לנשא KLH והוזרק לארנבות לקבלת נוגדן ספציפי פוליקלונלי.

שיטת הפיתוח של ה-Western blot היתה alkaline phosphatase conjugate (BioRad kit). איור 1 מסכם את תוצאות הניסוי לקביעת רמת האנזים F3'H בצמחי בקורת ביחס לצמחים שעברו שוק חום בשלבים 2 (B) ו-3 (C).

פקעים מצמחי בקורת נקטפו בשלבי התפתחות 2-7 ונעשה מיצוי חלבונים משלבים אלו (A). כמות החלבון שהועמסה בכל נתיב זהה. ניתן לראות ב-A1 שהסיגנל המתקבל בבלוט הינו ספציפי לחלבון במשקל מולקולרי מתאים לזה של האנזים F3'H, ועוצמת הסיגנל נחלשת עם התפתחות הפקע. מכאן שרמת האנזים ביחס לרמת החלבון הכללית, היא מקסימלית בשלבים מוקדמים של התפתחות ויורדת ככל שהפקע גדל. במקביל לצמחי הביקורת, פקעים בשלבים 2 (B) ו-3 (C) קבלו טיפול חום כמתואר במבוא, ורמת החלבון נבדקה בהם ביחס לפקעי הביקורת. למעשה לא ניתן לראות הבדל משמעותי ברמת האנזים כתוצאה מטיפול החום.

2. השפעת עקת חום חולפת על רמת האנזים CHS בפרחי יגואר.

מוצו חלבונים מפרחי ורד בשלבי התפתחות שונים על פי השיטה שפתחנו בשנת המחקר הראשונה. מיצויי החלבונים מהשלבים השונים וכן מפרחים שעברו עקת חום חולפת הופרדו על גיל אקרילמיד (12%) והועברו לממברנת ניטרוצלולוז. לפיתוח נוגדנים ספציפיים ל-CHS נבחרו מספר גנים המקודדים לאנזים בדו-פסיגיים, ומתוכם נבחרו מקטעים הומולוגים לכולם, בעזרת תוכנת GCG. מתוך מקטעים אלו נבחר מקטע של 15 חומצות אמינו. הוא נמצא בין ח. אמינו מס 311 לבין 325 וריצופו (DQVEIKLGLKPE). רצף זה עשיר בליזין גלוטמין ואספרטט, דבר המאפיין אתרים פעילים או קושרים באנזימים. המקטע נבדק שהוא ספציפי ל-CHS בעזרת תוכנת Blast. מקטע זה סונתז לפפטיד, חובר לנשא (KLH) והוזרק לארנבות לקבלת נוגדן ספציפי על ידי מעבדתו של פרופ' מתי פריטקין (מכון וייצמן).

באיור 2 ניתן לראות את הצטברות החלבון CHS במשך שלבי ההתפתחות של פקעי ביקורת וכן כתוצאה מעקת חום שניתנו בשלבי התפתחות 2 ו-3. ניתן לראות שבצמחי הביקורת ישנה עליה ברמת החלבון משלב 2 לשלב 3 ובהמשך הרמה אינה משתנה. בנוסף לכך, ניתן להבחין שהסיגנל בכל השלבים, מורכב משני בנדים צמודים. בפקעים שקיבלו עקת חום בשלב 2 (B), לא ניתן להבחין בשינוי כל שהוא בהצטברות החלבון CHS ביחס לביקורת. לעומת זאת, בפקעים שקיבלו עקת חום בשלב 3 (C), ניתן להבחין בהחלשת הסיגנל בשלב 7 ביחס לאותו שלב בביקורת (כ-20% ירידה). שלב 5 באותו הטיפול לא הושפע ביחס לביקורת.

3. השפעת עקת חום על פעילות האנזים CHI.

CHI (chalcone isomerase) פועל בתחילת מסלול הביסניתזה של האנטוציאנין. בניסוי זה נבדק האם לעקת החום ישנה השפעה על פעילות האנזים. מיצוי אנזים CHI פעיל נעשה על פי Lister and Lankester (1996) בשיטה שפותחה כדי להתמודד עם רקמות צמחיות עשירות בפולפנולים, כמו

בקליפת תפוח עץ. שיטה זו הוסבה על ידינו לשימוש בעלי כותרת של ורד שגם הם עשירים בפוליפנולים. הריאקציה נמדדה ספקטרופוטומטרית על ידי מדידת קצב האיזומריזציה של הסובסטרט Naringenin chalcone (הצהוב) והפיכתו לתוצר חסר צבע, באורך גל של 365 nm. האיזומריזציה הכללית שנמדדה, תוקנה על ידי הפחתת האיזומריזציה הספונטנית ובוטאה כפעילות ספציפית למשקל חלבון מסיס.

באיור 3 ניתן לראות שפעילות האנזים CHI בשלב 5 (יום לאחר גמר מתן העקה) לא השתנה בפקע שקיבל טיפול חום ביחס לביקורת. לעומת זאת, בשלב 7 ישנה ירידה של כ-20% בפעילות האנזים כתוצאה מהטיפול.

4. השפעת עקת חום על רמת התבטאות הגנים *chs* ו-*dfr*.

על מנת לקבוע האם הירידה בתכולת האנטוציאנין בפקע הפריחה בעקבות עקת חום נובעת מהשפעה על ביטוי גנים במסלול הביוסינתזה שלו, נבדקה התבטאותם של Chalcon synthase (*chs*) ושל Dihydroflavonol 4-reductase (*dfr*), שהם שניים מאנזימי מפתח במסלול, באמצעות אנליזת "northern": עבודה זו נעשתה בעזרתה של ד"ר אתי אור מהמכון למטעים במכון וולקני.

בשלב הראשון בודדנו מקטע של הרצף ל-*dfr* בורד כדי שישמש כגלאי לגן. כלל ה-RNA הופק מעלי כותרת של ורד (זן 'יגואר') ובעזרת ראקצית RT-PCR ופריימרים מתאימים הגברנו מקטע של כ-400 bp מרצף cDNA של הגן. פלסמיד (Lanbda Zap) שהכיל בתוכו מקטע של הגן ל-*chs* מורד, נתקבל על ידינו ממעבדתו של ד"ר דוד וייס מהפקולטה לחקלאות.

איור 4 מסכם תוצאות של שני נסיונות בהם עקת חום ניתנה לפקעים בשלב 2 (A1, B1) ובשלב 3 (A2, B2). פקעים שנחשפו לעקה בשלב 2, נקטפו בשלבים 3, 5 ו-7 ופקעים שנחשפו לעקה בשלב 3, נקטפו בשלב 5 (יום לאחר סיום העקה), לקביעת השפעת העקה על רמת הגנים. לביקורת נקטפו פרחים מאותם שלבים מצמחים שגדלו בטמפרטורת הביקורת (26°C/18°C). מאיור 4A1 ניתן לראות שבצמחי הביקורת ישנה מגמת הצטברות של תעתיקי *chs*, שמגיעה לשיאה בשלב 5. טיפול חום בשלב 2 גרם לירידה ברמת התעתיקים בכול השלבים שנבדקו. נראה כי, רמת התעתיקים בשלב 3, בטיפול החום, לא השתנתה משלב 2 (שלב מתן העקה). פגיעה משמעותית עוד יותר ברמת הביטוי של הגן נמצאה, כאשר עקת החום ניתנה בשלב 3 (4A1).

מהתוצאות המוצגות באיור 4B1 ניתן לראות, שישנה רמה נמוכה מאוד של תעתיקי *dfr* בשלב 2, והם מצטברים משמעותית משלב 3 עד שלב 7. טיפול החום בשלב 2 לא גרם לשינוי משמעותי בתכולת התעתיקים. לעומת זאת, טיפול חום בשלב 3 גרם לירידה משמעותית בתכולת התעתיקים של *dfr* (4B2).

5. בחינת השפעת טמפרטורת לילה גבוהה על צבע הפרחים.

על מנת לבחון השפעת טמפרטורת לילה גבוהה יחסית על צבע פרחי יגואר, התחלנו במערך ניסוי דומה למתואר במבוא, בו צמחי הביקורת גדלים בטמפרטורה של $26^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$ (לילה/יום), ופקעים בשלב התפתחות 3 (השלב שנמצא הרגיש ביותר לעקת חום ביום מבחינת צבע הפרחים) חוממו במתקן מיוחד במשך הלילה, כך הם שהו בטמפרטורה של 26°C לאורך כל היממה, עם לחות קבועה של כ-65%. יתר חלקי הצמח, כמו צמחי הביקורת, היו בתנאי $26^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$.

הניסוי הראשון עם טמפרטורות לילה גבוהות נמשך שלושה ימים, בדומה לנסיונות הקודמים עם טיפולי חום ביום. לאחר שלושה ימים הפקעים הוחזרו לתנאי גידול של צמחי הביקורת, ונקטפו בשלב קטיף. 2-3 עלי כותרת של הדור החיצוני בפרח נקטפו והוקפאו למיצוי אנטוציאנינים. איור 5 מתאר את תוצאות הניסוי והשפעת עקת חום לפקעים בשעות הלילה.

מכיון שטמפרטורת היום במתקן המיוחד אתו עבדנו לא השתווה לטמפרטורת החדר אלא נשאר גבוה בכ- 4°C , ובנוסף לזה ההבדלים ברמות האנטוציאנינים לא היו דרמטיות, חזרנו על הניסוי אך הפעם על ידי העברת הצמחים לתנאי יום לילה של 26°C בשלבים שונים של התפתחות הפקעים ועד לשלב הקטיף. בשלב הקטיף הפרחים נקטפו וריכוז האנטוציאנין בהם נמדד. איור 6 מתאר את תוצאות הניסוי.

טמפרטורת לילה גבוהה לא השפיעה על ריכוז האנטוציאנינים בפרחים שהועברו לתנאי העקה בשלב 1 של התפתחותם והשפיעה בירידה של כ-30% בפרחים שהועברו בשלב 3. פקעי פריחה משלב 1 היו בתנאי העקה במשך 9 ימים עד הגיעם לשלב קטיף, ופקעים בשלב 3 היו 3 ימים בתנאים אלו. נראה מתוצאות אלו שתנאי טמפרטורה גבוהה בלילה משפיעים פחות על צבע הפרחים ביחס לתנאי טמפרטורה גבוהה ביום. תוצאה זו מנוגדת לדעה הרווחת בקרב מגדלי הורדים שהאמינו שטמפרטורות לילה גבוהות הן הגורם העיקרי לדהיית הצבע בפרחים. בשנה השלישית למחקר נבחן תופעה זו ביתר פרוט על מנת לבסס את מסקנותינו.

מסקנות והשלכותיהן על המשך העבודה

1. הבנה מעמיקה יותר ברמה הביוכימית ומולקולרית של תופעת שינוי הרכב האנטוציאנינים

כתוצאה מעקת חום.

כאשר ניתנה עקת חום זמנית לפקעים בשלב ההתפתחות הרגיש ביותר, נראה כי פעילות האנזים CHI isomerase (Chalcon) ונוכחותו של החלבון CHS (Chalcon synthase) ירדו מעט בשלבי התפתחות מאוחרים. עקת חום זמנית, שניתנה בשלב התפתחות מוקדם יותר, לא השפיעה משמעותית על תכולתם של החלבונים CHS ו-F3'H (Flavonoid 3'-hydroxylase), למרות שערכה את הצטברות הפיגמנט. לעומת זאת, כמות התעתיקים של הגנים *chs* ו-*dfr* (Dihydroflavonol-4-reductase) ירדה מיד בסיום העקה, כאשר היא ניתנה בשלבי ההתפתחות הרגשים של הפקע. ישנה קורלציה בין דפוס הצטברות תעתיקי גנים אלו בצמחי ביקורת, לבין דפוס

הצטברות הפיגמנט בפרח. לא ברור מדוע אין התאמה בין התבטאותו הנמוכה יותר של הגן *chs* בעקבות עקת החום, לבין תכולת החלבון *chs* באותם הטיפולים שכאמור לא השתנתה משמעותית. כמו כן, לא ברור האם הטמפרטורה הגבוהה משמשת כסיגנל מדכא לשעתוק הגנים הספציפיים הללו ואחרים במסלול הביוסינתזה של האנטוציאנין ו/או משפיעה על יציבותם של התעתיקים ו/או מאיטה שעתוק של גנים בצורה כללית.

לא ברור מדוע אין התאמה בין התבטאותו הנמוכה יותר של הגן *chs* בעקבות עקת החום, לבין תכולת החלבון *chs* באותם הטיפולים שכאמור לא השתנתה משמעותית. כמו כן, לא ברור האם הטמפרטורה הגבוהה משמשת כסיגנל מדכא לשעתוק הגנים הספציפיים הללו ואחרים במסלול הביוסינתזה של האנטוציאנין ו/או משפיעה על יציבותם של התעתיקים ו/או מאיטה שעתוק של גנים בצורה כללית. הממצאים של השפעת עקת החום על ביטוי חלק מהגנים והחלבונים של מסלול ביוסינתזה האנטוציאנין לא מסבירים את עיכוב יצירת הפיגמנט. למרות שנמצאה השפעה ברורה של עקת החום על ביטוי הגנים, כמעט ולא נמצאו שינויים ברמת החלבונים. נדרשת בדיקה מקיפה יותר כדי להבין את מכלול הסיבות לפגיעה בצבע הפרח.

2. השפעת תנאי טמפרטורות לילה גבוהות על הצבע.

בחנו השפעת טמפרטורות לילה גבוהות על רמת האנטוציאנינים בורדים. נראה מהתוצאות בדוח זה שתנאי טמפרטורה גבוהה בלילה משפיעים פחות על צבע הפרחים ביחס לתנאי טמפרטורה גבוהה ביום. תוצאה זו מנוגדת לדעה הרווחת בקרב מגדלי הורדים שהאמינו שטמפרטורות לילה גבוהות הן הגורם העיקרי לדהיית הצבע בפרחים.

פרסומים

1. Dela G., Or E., Ovadia R., Nissim-Levi A., Weiss D. and Oren-Shamir M. (2003). Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. Plant Sci., 164, 333-340.

תשובות לשאלות מנחות

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח

שתי המטרות העקריות של העבודה היו: 1. הבנה מעמיקה יותר ברמה הביוכימית ומולקולרית של תופעת שינוי הרכב האנטוציאנינים כתוצאה מעקת חום חולפת, ו-2. המשך האפיון הפיזיולוגי של השפעת תנאי טמפרטורה שונים על צבע הפרחים, ובעיקר השפעת טמפרטורות לילה גבוהות על הצבע.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

ברמה הביוכימית. מולקולרית מצאנו ש: א. פעילות האנזים *Chalcone isomerase* (CHI) ונוכחותו של החלבון *Chalcone synthase* (CHS) ירדו מעט בשלבי התפתחות מאוחרים. ב. כמות התעתיקים של הגנים *chs* ו-*dfr* (*Dihydroflavonol-4-reductase*) ירדה מיד בסיום העקה, כאשר היא ניתנה בשלבי ההתפתחות הרגילים של הפקע. בבחינת השפעת טמפרטורות לילה גבוהות על צבע הפרחים, נראה שהשפעת טמפרטורת לילה פחות משמעותית מבחינת צבע הפרחים מאשר טמפרטורות יום גבוהות.

3. המסקנות המדעיות והשלכותיהן להמשך המחקר

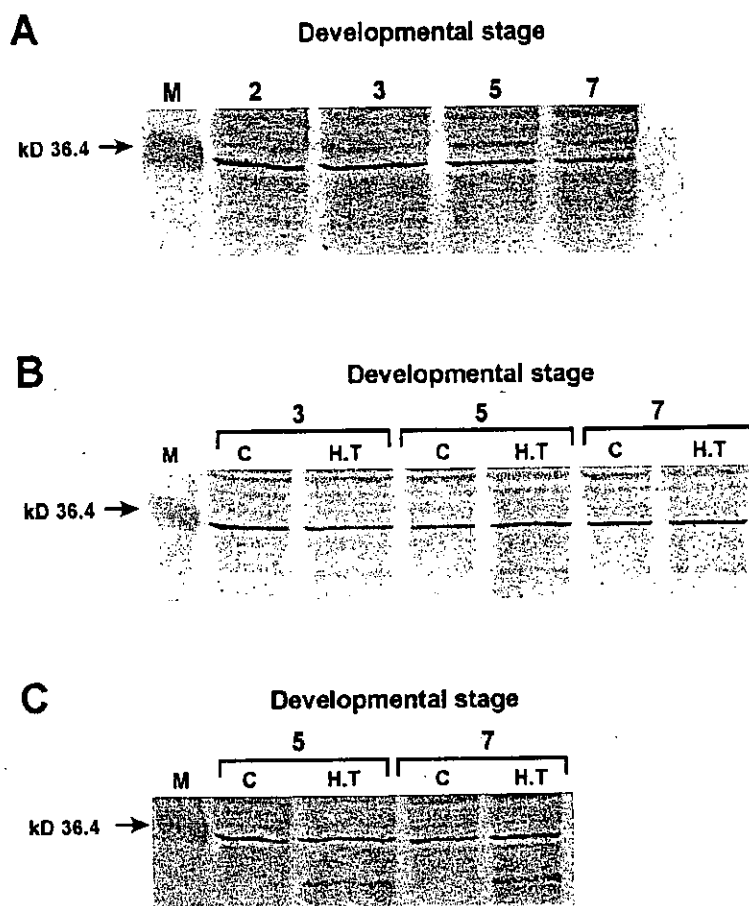
המסקנות העקריות הן: א. ברמה הביוכימית, למרות שנמצאה השפעה ברורה של עקת החום על ביטוי הגנים, כמעט ולא נמצאו שינויים ברמת החלבונים. נדרשת בדיקה מקיפה יותר כדי להבין את מכלול הסיבות לפגיעה בצבע הפרח. ב. נראה שלטמפרטורות הלילה השפעה מועטה על צבע הפרחים.

4. הבעיות שנתרו לפתרון

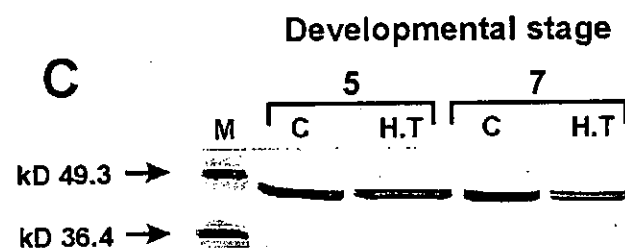
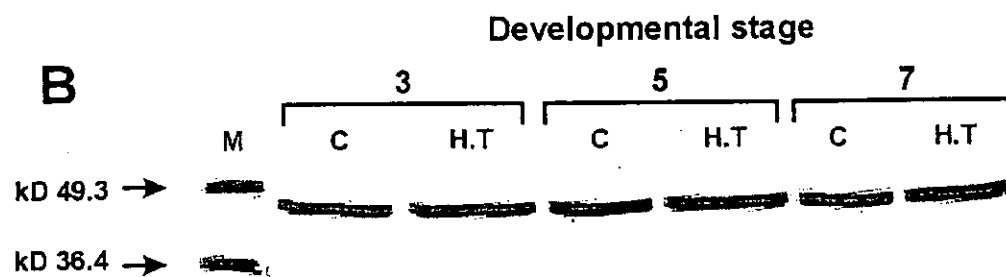
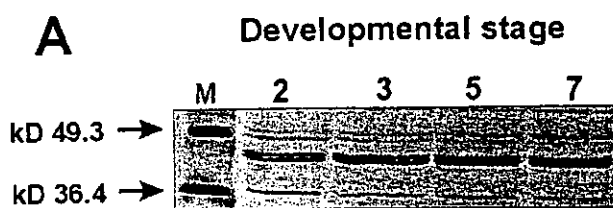
למרות שנמצאה השפעה ברורה של עקת החום על ביטוי הגנים, כמעט ולא נמצאו שינויים ברמת החלבונים. נדרשת בדיקה מקיפה יותר כדי להבין את מכלול הסיבות לפגיעה בצבע הפרח.

5. הפצת הידע

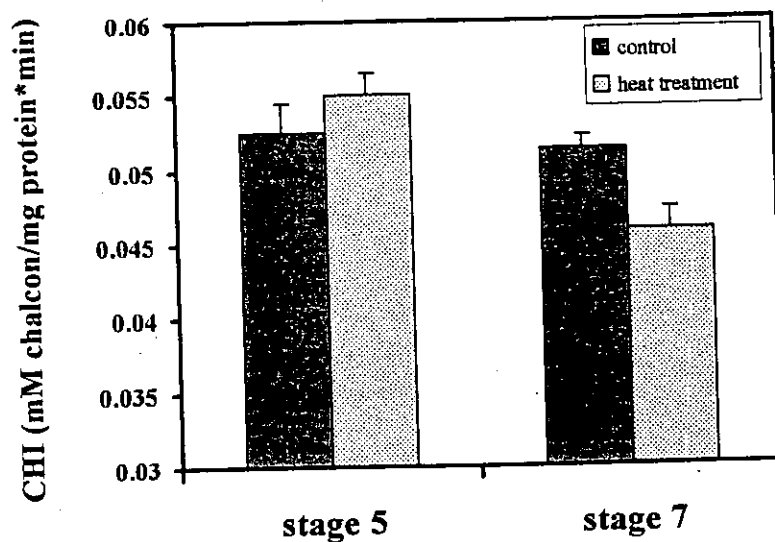
1. Dela G., Or E., Ovadia R., Nissim-Levi A., Weiss D. and Oren-Shamir M. (2003). Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. Plant Sci. 164, 333-340.



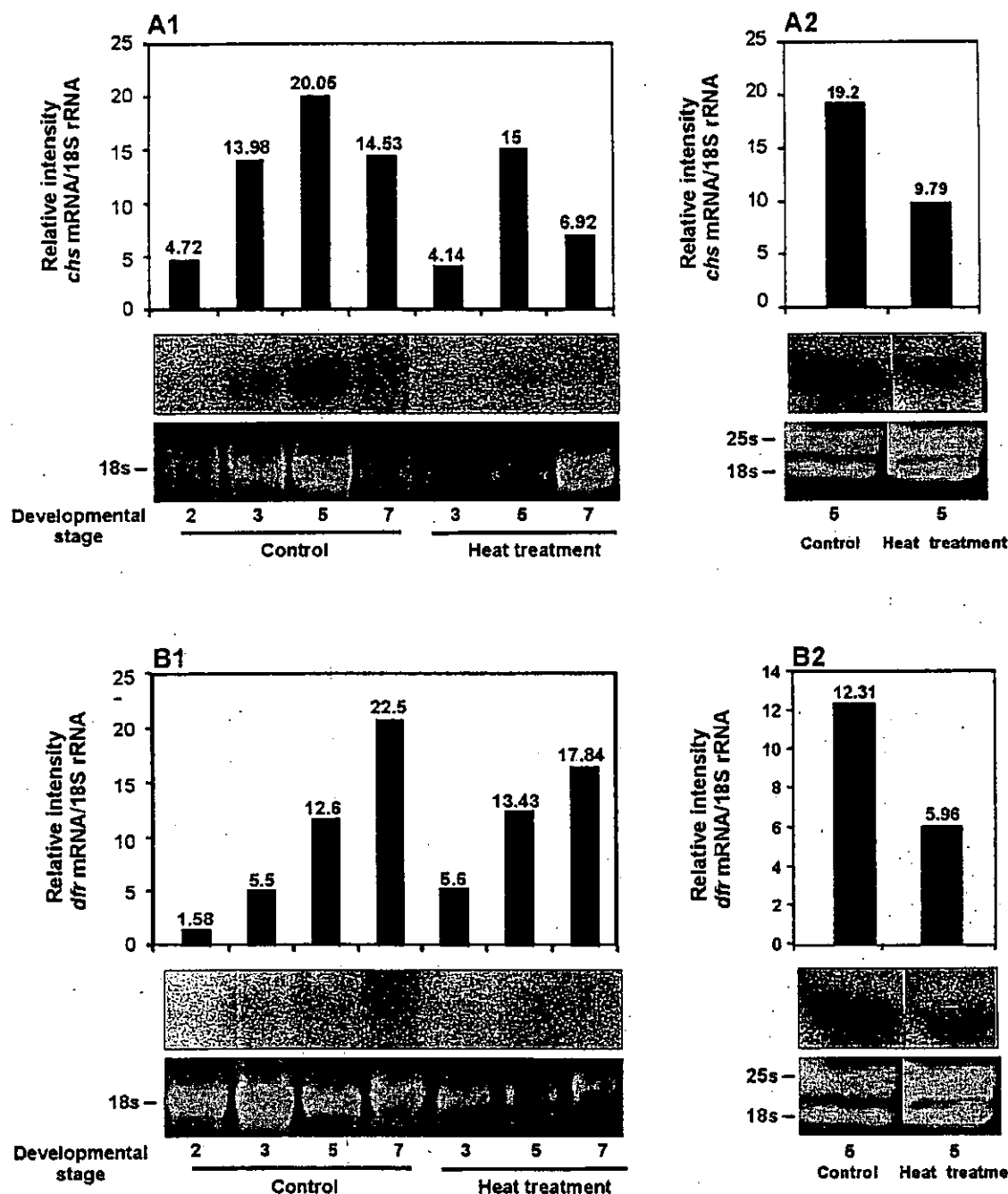
איור 1: Western blot לחלבון F3'H. חלבון כללי מוצא מפקעי יגואר בשלבי התפתחות שונים. מיצויי החלבון הופרדו על גיל והועברו לממברנת ניטרצלוז. האיור מראה את תגובת הממברנה לטיפול עם נוגדן ספציפי לאנזים F3'H. צמחי הביקורת (A) גדלו בתנאי 26°C/18°C יום ולילה. בצמחים שטופלו בחום, פקעים בשלבים 2 (B) ו-3 (C) הוכנסו לתנאי טמפרטורה של 39°C ביום (למשך 12 שעות) ו-18°C בלילה, עם לחות קבועה של 75%-80% למשך שלושה ימים. לאחר טיפול החום, הפקעים הוחזרו לתנאי טמפרטורה של הצמח כולו עד להגיעם לשלב קטיף (7). באיורים B ו-C ישנה השוואה בין פקעים של צמחי הביקורת לאלו שעברו טיפול חום.



איור 2: אנליזת Western לבחינת רמת החלבון CHS בעקבות עקת חום. עקת חום ל-3 ימים ניתנה לפקעים בשלבים 2 ו-3. לאחר מתן השוק, הצמחים הועברו להמשך גידולם בטמפי' הביקורת. פקעים שקיבלו טיפול חום בשלב 2, נקטפו בשלבים 3, 5 ו-7. פקעים שקיבלו טיפול חום בשלב 3, נקטפו בשלבים 5 ו-7. פקעי ביקורת נקטפו בשלבים 2, 3, 5 ו-7. (A) 7-ו-5, 3, 2. (B) 7-ו-5, 3. (C) 7-ו-5, 3.



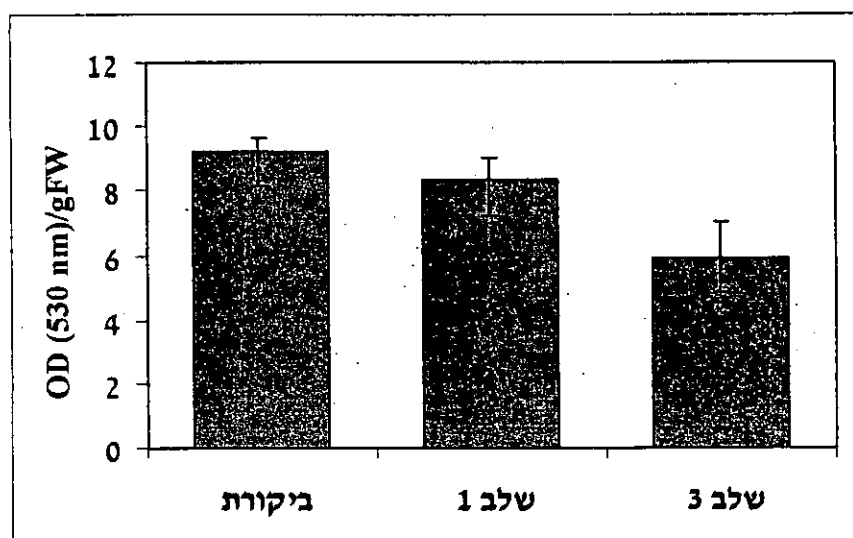
איור 3: השפעת עקת חום על פעילות האנזים CHI בפקע. לפקעים בשלב 3 נתנה עקת חום של 3 ימים. פקעים אלו נקטפו בשלב 5 ו-7, חלבון פעיל הופק מהם ונערכה ראקציה אנזימטית ספציפית ל-CHI. הערכים הנם ממוצעים של 3 פקעים מכל שלב שמהם הופק מיצוי אחד של חלבון פעיל, ומכל מיצוי נערכו 5 ראקציות שונות.



איור 4: השפעת עקת חום בשלבים 2 (A1,B1) ו-3 (A2, B2) של התפתחות הפקעים, על רמות ביטוי הגנים *chs* (A1,A2) ו-*dfr* (B1,B2). טמפרטורת הביקורת היתה $26^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$. עבור כל אנליזה מוצג גם ה-RNA הריבוזומלי. הפילם והגיל נסרקו והערכה כמותית של הסיגנלים בוצעה בעזרת תוכנת TINA. התוצאות המוצגות התקבלו על ידי חלוקה של עוצמת הסיגנל שהתקבל בהיברידיזציה בעוצמה היחסית של RNA ריבוזומלי 18S.



איור 5: השפעת טמפרטורת לילה גבוהה לפקעים בלבד. הצמחים הוכנסו לתנאי טמפרטורה של $26^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$. מצמחי הביקורת נלקחו פקעים בשלב קטיף. הטיפול בחום נעשה על הפקעים בלבד על ידי הכנסתם (מבלי שינוותקו מהצמח) למתקן שבו טמפרטורת הלילה היתה גם היא 26°C . הפקעים הוכנסו לתנאים אלו בשלב 3 למשך שלושה ימים ואז הוצאו מהמתקן ועל ידי כך הוחזרו לתנאי הביקורת. הקווים האנכיים מייצגים סטיית תקן של 4 חזרות.



איור 6: השפעת טמפרטורת לילה גבוהה על הצמח השלם. צמחי הביקורת היו בתנאים של $26^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$. צמחי הטיפול הועברו לתנאים של $26^{\circ}\text{C}/26^{\circ}\text{C}$ עם פקעים מסומנים בשלב 1 ובשלב 3. הפקעים של צמחי הטיפול נקטפו בשלב קטיף (3 ימים לאחר התחלת הטיפול לפקעים בשלב 3, ו-9 ימים לאחר התחלת הטיפול לפקעים בשלב 1). הקווים האנכיים מייצגים סטיית תקן של 6 חזרות.